

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年5月2日 (02.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/34292 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 39/395, A61P 17/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09409

(22) 国際出願日: 2001年10月25日 (25.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-325904  
2000年10月25日 (25.10.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤裕章 (ITO, Hiroaki) [JP/JP]; 〒659-0028 兵庫県芦屋市打出小槌町9-12-502 Hyogo (JP). 吉崎和幸 (YOSHIZAKI, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒659-0042 兵庫県芦屋市緑町3-8-4 Hyogo (JP). 西本憲弘 (NISHIMOTO, Norihiro) [JP/JP]; 〒562-0011 大阪府箕面市如意谷4-6-9-804 Osaka (JP). 岸本忠三 (KISHIMOTO, Tadamitsu) [JP/JP]; 〒584-0021 大阪府富田林市中野町3-5-31 Osaka (JP). 島岡伸 (SHIMAOKA, Shin) [JP/JP]. 北村秀智 (KITAMURA, Hidetomo) [JP/JP]. 杉本正道 (SUGIMOTO, Masamichi) [JP/JP]. 赤松健一 (AKAMATSU, Kenichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 石田敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR PSORIASIS CONTAINING AS THE ACTIVE INGREDIENT IL-6 ANTAGONIST

A1 (54) 発明の名称: IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤

WO 02/34292 (57) Abstract: Preventives or remedies for psoriasis which contain an interleukin-6 (IL-6) antagonist such as an antibody against IL-6 receptor.

(57) 要約:

インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えばIL-6受容体に対する抗体、を含んで成る乾癬の予防又は治療剤。

## 明細書

## IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤

## 発明の分野

本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤に関する。

## 背景技術

IL-6はB細胞刺激因子2 (BSF2)あるいはインターフェロン $\beta$ 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., *Nature* (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., *Adv. in Immunology* (1993) 54, 1-78)。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz, M. et al., *J. Exp. Med.* (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である (Taga, T. et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., *Science* (1987) 241, 825-828)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kDの膜蛋白質gp130である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受

容体複合体を形成し、次いでgp130 と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581)。

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質である。これまでに、IL-6に対する抗体（抗IL-6抗体）、IL-6受容体に対する抗体（抗IL-6受容体抗体）、gp130 に対する抗体（抗gp130 抗体）、IL-6変異体、IL-6又はIL-6受容体部分ペプチド等が知られている。

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146 、 Huang, Y. W. et al ., Hybridoma (1993) 12, 621-630 、国際特許出願公開番号W0 95-09873 、フランス特許出願公開番号FR 2694767 、米国特許番号US 5 21628 )。その一つであるマウス抗体PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている (国際特許出願公開番号W0 92-19759)。

乾癬は一般に慢性・難治性の皮膚病であり、円形や橢円形の盛り上った赤い部分（紅斑）上に白色又は銀白色の角質を形成しているという外観を有する。乾癬は炎症性角化症の代表的な皮膚病であり、この炎症性角化症は、リンパ球などの白血球が皮膚に侵入することにより生ずる「炎症」と皮膚の表皮が厚くなり角層も厚くなる「角化症」が同時に起っている皮膚症状である。

乾癬は、症状により尋常性乾癬、関節症性乾癬、膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症、及び滴状乾癬に分けられるが、その発症原因や発症機作は解明されていない。しかしながら、リンパ球抑制活性を有するサイクロスボリンが乾癬の治療効果を有すること等から、リンパ球が

関与しているとする説が存在する。

乾癬の治療剤としては、皮膚の炎症を抑制するためのステロイド外用剤、サイクロスボリン内服薬、メソトレキセート内服薬、紫外線療法等；表皮の増殖（角化症）を抑制するためのビタミンD外用剤、レチノノド（チガソン）内服薬、紫外線療法等；並びにその他の個別の関連症状を治療するための非ステロイド系消炎鎮痛剤（関節症乾癬の関節炎に対して）、抗生物質（関連する感染症に対して）、などが知られている。

しかしながら、これまでに乾癬において抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストを用いIL-6の生物学的活性を特異的に抑制する試みはなされておらず、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが乾癬に治療効果を示すことは知られていなかった。

#### 発明の開示

本発明は、新しいタイプの乾癬の予防又は治療剤を提供しようとするものである。

すなわち、本発明は、（1）IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（2）IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（3）IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（4）ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはPM-1抗体である。

本発明はまた、（5）マウスIL-6受容体に対するモノクローナル

抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはMR16-1抗体である。

本発明はまた、(6) IL-6受容体に対する組換え型抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。IL-6受容体に対する組換え型抗体は、好ましくはヒト抗体定常領域(C領域)を有する。

本発明はまた、(7) IL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、(8) ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤を提供する。

#### 発明の実施の形態

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、乾癬の予防又は治療効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6、IL-6受容体及びgp130のいずれかの結合に対する阻害作用を有する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、例えば抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6変形体、可溶性IL-6受容体変形体あるいはIL-6又はIL-6受容体の部分ペプチドおよび、これらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハ

イブリドーマに產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

抗IL-6抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 153 4-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適當な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポ

リクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hi rata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号WO 92-19759)などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体產生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1 丁目1 番地1 中央第6)に、1988年7月12日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR16-1抗体產生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR16-1として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1 丁目1 番地1 中央第6)に、1997年3月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

抗IL-6受容体モノクローナル抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公

知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌（E. coli）は、1989年1月9日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、HB101-pIBIBSF2Rと

して、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明で使用される抗gp130 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130 と結合することにより、IL-6／IL-6受容体複合体のgp130 への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、AM64抗体（特開平3-219894）、4B11抗体および2H4 抗体（US 5571513）B-S12 抗体およびB-P8抗体（特開平8-291199）などが挙げられる。

抗gp130 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130 を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130 は、欧州特許出願公開番号EP 411946 に開示されたgp130 遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130 の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130 蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130 受容体

蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130 を発現している細胞や gp130 蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.6 53 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550) 、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7) 、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519) 、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415) 、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270) 、FO (de St. Groth, S. F. et al.

1. , J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21 ) 、 S194 (Trowbridge , I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) 、 R210 (Galfre, G. et al. , Nature (1979) 277, 131-133 ) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C. , Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37°C程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000 程度のPEG 溶液を通常、30-60 % (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液)

で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作B リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266 と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

例えば、抗IL-6受容体抗体產生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国

茨城県つくば市東1 丁目1 番地1 中央第6)に、1988年7 月12日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5 %BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 製) 含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地 (GIBCO-BRL 製)、PFHM-II 培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を產生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変 (V) 領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987)162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V 領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)

およびPCR を用いた5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932 ) を使用することができる。得られたPCR 産物から目的とするDNA 断片を精製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNA の塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV 領域をコードするDNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV 領域をコードするDNA を、抗体C 領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V 領域をコードするDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするDNAを含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月11日に、各々NCIMB 40366及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照)。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(FR; framework region)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、 $C\gamma$ が挙げられ、例えば、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 又は $C\gamma 4$ を使用することができる。また、抗体又はそ

の產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照）。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV 40）等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$ （HEF1 $\alpha$ ）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法（Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114）、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場

合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40 、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の產生系を使用することができる。抗体製造のための產生系は、*in vitro*および*in v*

ivo の產生系がある。in vitroの產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる產生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を產生してもよい。

一方、in vivo の產生系としては、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを

用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* 又は *in vivo* の產生系にて抗体を產生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、

あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させててもよい（国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照）。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv (scFv) が挙げられる。

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを鏽

型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合せて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティクロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、PROS、Sephadex G-25等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、上記アフィニティーコロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100  $\mu$ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4 °Cで一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPHEL製) 100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO96-17869に開示されている。

本発明で使用されるIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。この

ようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 藩修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 $\alpha$ -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの $\alpha$ -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン

酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストのIL-6シグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6依存性細胞MH60.BSF2を培養し、これにIL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取込みを測定すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266を培養し、<sup>125</sup>I標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した<sup>125</sup>I標識IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6アンタゴニストを存在させる群に加えIL-6アンタゴニストを含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6アンタゴニストのIL-6阻害活性を評価することができる。

本発明の効果を確認するには、例えば CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> T細胞を移植して乾癬類似病変を発症した動物に本発明で使用されるIL-6アンタゴニストを投与し、皮膚組織を観察して、乾癬類似病変の改善を評価することにより行うことができる。

乾癬類似病変を誘導するための CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> T細胞は、例えばF2 (BALB/c×129/SvJ)マウス脾臓より調製することができ、例えば後述の実施例に記載の方法に従えばよい。また、乾癬類似病変を誘導する動物としては、例えばマウスなど好ましくはSCIDマウスなどを用いることができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により、乾癬を発症した実験動物において、乾癬類似病変の改善が認められたことから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは乾癬治療効果を有することが示された。

本発明における治療対象は哺乳動物である。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトである。

本発明の予防又は治療剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000 mg、好ましくは 5～50 mg の投与量を選ぶことができる。

本発明の予防又は治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビ

ニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレン glycol、ポリエチレン glycol、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

### 実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例

##### 方法

Schon MPら (Nature Medicine (1997) 3, 183-188) の方法に従つて、BALB/cマウス脾臓細胞を溶血後、MACSカラム及びFACS Vantage を用いて、 $CD4^+ CD45RB^{high}$  T細胞を調製し、 $4.0 \times 10^5$  細胞/head でC.B-17 scid マウスにi.p.移植した。

細胞移植15分後に抗IL-6受容体抗体 (MR16-1) を2 mg/head でi.p.投与した。ネガティブ及びポジティブコントロール群 (細胞非移植群及び細胞移植群) にはPBS を投与した。その後、1 mg/head/週にてMR16-1の投与を行い、細胞移植より約8週間経過後にマウスを安樂死させ、耳を採取しホルマリン固定した。定法に従い、病理組織を作製しHE染色後、耳の皮膚組織を観察し、以下の基準に従い乾

癬類似病変のスコア判定を行った。

- ー：正常、
- ±：表皮の肥厚がやや認められる、
- +：表皮の肥厚が認められる、
- ++：表皮の肥厚が顕著に認められる。

統計解析は、SASにより、Wilcoxonの順位和検定を行い、有意水準を5%とした。

### 結果

表1に示すように、細胞を移植することにより有意な乾癬類似病変スコア上昇が認められ、実験系の成立が示された。細胞移植群に抗IL-6受容体抗体であるMR16-1を投与することにより、有意な乾癬類似病変スコアの改善が認められた。以上より、抗IL-6受容体抗体は、新たな乾癬治療薬となる可能性が示された。

表1

#### 病理組織評価

群	乾癬類似病変スコア				Wilcoxon 順位和検定
	ー	±	+	++	
細胞非移植群 (n=8)	7	1	0	0	
細胞移植群 (n=7)	2	0	2	3	P=0.0126、 vs細胞非移植群
細胞移植+MR16-1投与群 (n=5)	5	0	0	0	P=0.0221、 vs細胞移植群

#### 参考例1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製)に挿入した。IL-6受容体

cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジエネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia製) と連結させ、プラスミドpSVL344を得た。dhfr のcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

10  $\mu$ g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) へカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FCS、100U/ml のペニシリンおよび 100  $\mu$ /ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含  $\alpha$  MEM 選択培養液で3 週間培養した。

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM~200nM の濃度のメトトレキセートで増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコープ改変ダルベコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。その結果、培養上清中には可溶性IL-6受容体が存在することが確認された。

#### 参考例2. 抗ヒトIL-6抗体の調製

10  $\mu$ g の組換型IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (198

8) 17, 41 ) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局部のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT 培養液を用いるOিらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980 ) に従って選択し、抗ヒトIL-6抗体を產生するハイブリドーマを樹立した。

抗ヒトIL-6抗体を產生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で 100  $\mu$ l のヤギ抗マウスIg (10  $\mu$ l/ml, Cooper Biomedical, Inc 製 Malvern, PA) により4 °Cで一晩コートした。次いで、プレートを 100  $\mu$ l の1 %ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS により室温で2 時間処理した。

これをPBS で洗浄した後、 100  $\mu$ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 °Cにて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように  $^{125}$ I 標識組換型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 ハイブリドーマクローンのうち32のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが產生する抗IL-6抗体MH166 はIgG1 $\kappa$ 型のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH60.BSF2 を用いてMH166 抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を

調べた。MH60.BSF2 細胞を  $1 \times 10^4$  /200  $\mu$  l/穴となるように分注し、これに MH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、0.5  $\mu$  Ci/穴の  $^3$ H チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体は IL-6 により誘導される MH60.BSF2 細胞の  $^3$ H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体は IL-6 の活性を中和することが明らかとなった。

#### 参考例 3. 抗ヒト IL-6 受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) により作成した抗 IL-6 受容体抗体 MT18 を CNBr により活性化させたセファロース 4B (Pharmacia Fine Chemicals 製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6 受容体 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株 U266 を 1% ジギトニン (Wako Chemicals 製), 10 mM トリエタノールアミン (pH 7.8) および 0.15M NaCl を含む 1 mM p-ペラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオライドハイドロクロリド (Wako Chemicals 製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース 4B ビーズと結合させた MT18 抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で 6 回洗浄し、免疫するための部分精製 IL-6 受容体とした。

BALB/c マウスを  $3 \times 10^9$  個の U266 細胞から得た上記部分精製 IL-6 受容体で 10 日おきに 4 回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にて IL-6 受容体への結合活性を調べた。 $5 \times 10^7$  個の U266 細胞を

$^{35}\text{S}$  - メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により $^{35}\text{S}$  - メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris (pH 7.4) で中和した。

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Phramacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの $^{35}\text{S}$  標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から產生される抗体は、IgG1 $\kappa$ 型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が產生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換型IL-6を大腸菌より調製し (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45) 、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により $^{125}\text{I}$  標識した (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981) 。

$4 \times 10^5$  個のU266細胞を1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの $^{125}\text{I}$  標識IL-6とともに培養した。70 $\mu\text{l}$  のサンプルを 400 $\mu\text{l}$  のマイクロフュージポリエチレンチューブに 300 $\mu\text{l}$  のFCS 上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が產生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 参考例4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173 に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を產生するCHO 細胞を10%FCSを含むIMDM 培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12 (上記Saito, T. et al 参照) をAffigel 10ゲル (Biorad製) に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

得られたマウス可溶性IL-6受容体50  $\mu$ g をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウィスターラットの腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラット脾臓細胞を採取し、 $2 \times 10^8$  個を $1 \times 10^7$  個のマウスミエローマ細胞P3U1と50% のPEG1500 (Boehringer Mannheim 製) をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラットIgG 抗体 (Cappel製) をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフェオスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG によるELISA 法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を產生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の產生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

このハイブリドーマが產生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 141, 951-956) を用いた  $^3$ H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を $1 \times 10^4$  個/200  $\mu$ l/ウェルと

なるように調製した。このプレートに10pg/ml のマウスIL-6とMR1-6-1抗体又はRS12抗体を12.3~1000ng/ml 加えて37°C、5%CO<sub>2</sub> で44時間培養した後、1 μ Ci/ ウエルの <sup>3</sup>H チミジンを加えた。4 時間後に <sup>3</sup>H チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60·BSF2 細胞の <sup>3</sup>H チミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1が產生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが乾癬の治療効果を有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニストは乾癬等の治療剤として有用であることが明らかにされた。

#### 第13規則の2に規定する寄託された微生物への言及 国際寄託当局

名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター  
あて名：〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1  
中央第6

#### 寄託日及び寄託番号：

(1) 寄託微生物の名称：HB101-pIBIBSF2R

寄託日： 1989年1月9日

寄託番号： FERM BP-2232

(2) 寄託微生物の名称：PM1

寄託日： 1989年7月12日

寄託番号： FERM BP-2998

(3) 寄託微生物の名称：Rat-mouse hybridoma MR16-1

寄託日： 1997年3月13日

寄託番号 : FERM BP-5875

## 請求の範囲

1. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防又は治療剤。
2. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項1記載の予防又は治療剤。
3. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項2に記載の予防又は治療剤。
4. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項3に記載の予防又は治療剤。
5. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項3に記載の予防又は治療剤。
6. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項2～5のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。
7. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項4に記載の予防又は治療剤。
8. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項5に記載の予防又は治療剤。
9. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項2～4のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。
10. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項9に記載の予防又は治療剤。
11. 乾癬の予防又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。
12. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項11記載の使用。

13. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項12に記載の使用。
14. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項13に記載の使用。
15. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項13に記載の使用。
16. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項12～15のいずれか1項に記載の使用。
17. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項14に記載の使用。
18. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項15に記載の使用。
19. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項12～14のいずれか1項に記載の使用。
20. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項19に記載の使用。
21. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを対象に投与することを含んで成る乾癬の予防又は治療方法。
22. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項21記載の方法。
23. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項22に記載の方法。
24. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項23に記載の方法。
25. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項23に記載の方法。

26. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項22～25のいずれか1項に記載の方法。
27. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項24に記載の方法。
28. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項25に記載の方法。
29. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。
30. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項29に記載の方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09409

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P17/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P17/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1940-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Atsushi OGATA, et al., Cytokine: esp. IL-6 no Kenkyu no Shinpo to Rinsho Ouyou, Rinsho Byouri, 1999, Vol.47, No.4, pp.321-326, Full text, esp., ABSTRACT, Chapters VI, VIII	1-20
Y	Takagi, Nobuhiro et al., Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, Arthritis Rheum. 1998, Vol.41, No.12, pp.2117-2121	1-20
Y	EP 409607 A2 (Kishimoto, Tadamitsu), 23 January, 1991 (23.01.1991), & JP 3-139293 A & US 5670373 A	1-20
X	EP 448181 A2 (Gist-Brocades N. V.), 25 September, 1991 (25.09.1991), whole document, especially p.8, right column, line 38 & JP 8-99996 A	1
X	WO 94/8574 A1 (Otsuka America Pharmaceutical, Inc.), 28 April, 1994 (28.04.1994), whole document, especially, Claim 20	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 January, 2002 (22.01.02)

Date of mailing of the international search report  
05 February, 2002 (05.02.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/09409

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP 664700 A1 & JP 8-502295 A & US 5453444 A	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/09409

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 21-30  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Claims 21 to 30 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/09409

Claims 1 and 11 relate to preventives or remedies for psoriasis containing as the active ingredient a compound which is defined by a desired property, i.e., "interleukin-6 antagonist". Thus, claims 1 and 11 involve any compounds having such property in the scope. However, it is recognized that only small part of the claimed compounds are exclusively supported by the description under the provision of Article 6 of the PCT and disclosed therein under the provision of Article 5 of the PCT.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that the scope of compounds having such property of "interleukin-6 antagonist" could be specified. Thus, claims 1 and 11 also fail to satisfy the requirement of clearness as defined in Article 6 of the PCT.

Therefore, the search has been practiced mainly on the relation between interleukin-6 agonist and psoriasis and remedies for psoriasis containing as the active ingredient the antibodies as set forth in claims 2 to 10 which are specifically cited in the description.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K45/00, 39/395, A61P17/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K45/00, 39/395, A61P17/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年  
 日本国公開実用新案公報 1971-1992年  
 日本国登録実用新案公報 1994-1996年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)、BIOSIS (STN)、MEDLINE (STN)、EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	緒方 篤 外, サイトカイン:特にIL-6の研究の進歩と臨床応用, 臨床病理, 1999, Vol. 47, No. 4, P. 321-326, 全文, 特にABSTRACT, VI章, VIII章	1-20
Y	Takagi, Nobuhiro et. al., Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, Arthritis Rheum. 1998, Vol. 41, No. 12, P. 2117-2121	1-20

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願目前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 22.01.02	国際調査報告の発送日 05.02.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	EP 409607 A2(Kishimoto, Tadamitsu)1991.01.23 & JP 3-139293 A & US 5670373 A	1-20
X	EP 448181 A2(Gist-Brocades N. V.)1991.09.25, whole document, especially p. 8, right column, line 38 & JP 8-99996 A	1
X	WO 94/8574 A1(Otsuka America Pharmaceutical, Inc.)1994.04.2 8, whole document, especially claim 20 & EP 664700 A1 & JP 8-502295 A & US 5453444 A	1

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 21-30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲21～30は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲                    は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲                    は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の单一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1、11は、「インターロイキン-6アンタゴニスト」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする乾癬の予防又は治療剤に関するものである。そして、請求の範囲 1 及び 11 は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「インターロイキン-6アンタゴニスト」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲 1 及び 11 は、PCT 6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、インターロイキン-6アンタゴニストと乾癬との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲 2 ~ 10 に記載の抗体を有効成分とする乾癬の治療剤を中心に行った。